

PENGARUH PEMBERIAN *DARK CHOCOLATE* TERHADAP JUMLAH SPERMATOZOA MENCIT *BALB/C* JANTAN YANG DIPAPAR ASAP ROKOK

Arinta Retno Anggi¹, Eka Chandra Herlina²

¹Mahasiswa Program Pendidikan S-1 Kedokteran Umum, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

²Staf Pengajar Bagian Biologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. H. Soedarto, SH., Tembalang-Semarang 50275, Telp. 02476928010

ABSTRAK

Latar belakang : Asap rokok merupakan senyawa radikal bebas yang dapat menyebabkan keadaan patologis pada tubuh, salah satunya dapat memberikan gangguan pada jumlah spermatozoa. *Dark chocolate* adalah salah satu makanan yang sangat bermanfaat bagi kesehatan, kandungan flavonoidnya yang berfungsi sebagai antioksidan mampu menurunkan jumlah rantai radikal bebas pada oksidasi lipid.

Tujuan : Membuktikan pemberian *dark chocolate* dengan dosis bertingkat dapat mempengaruhi jumlah spermatozoa pada mencit *Balb/c* jantan yang dipapar asap rokok.

Metode : Penelitian ini menggunakan *post test only control group design*. Jumlah sampel sebanyak 40 mencit *Balb/c* jantan yang dibagi menjadi 5 kelompok. Kelompok K(-) adalah kelompok tanpa perlakuan. Kelompok K(+) hanya diberi paparan asap rokok. Kelompok P1 dipapar asap rokok dan diberi *dark chocolate* dosis 0,05 gram/hari. Kelompok P2 dipapar asap rokok dan diberi *dark chocolate* dosis 0,1 gram/hari. Kelompok P3 dipapar asap rokok dan diberi *dark chocolate* dosis 0,2 gram/hari. Perlakuan selama 28 hari, pada hari ke-29 semua mencit diterminasi dan diperiksa jumlah spermatozoanya.

Hasil : Rerata jumlah spermatozoa adalah: Kelompok K(-)=22,9; Kelompok K(+)=4; Kelompok P1=11,5; Kelompok P2=19,6; Kelompok P3=20,6. Uji *Oneway ANOVA* didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelima kelompok tersebut. Uji *Post-Hoc* didapatkan perbedaan bermakna antara K(-) dengan K(+), K(-) dengan P1, K(+) dengan P1, K(+) dengan P2, K(+) dengan P3, P1 dengan P2, dan P1 dengan P3.

Kesimpulan : Pemberian *dark chocolate* dengan dosis 0,05 gram setiap hari selama 28 hari dapat meningkatkan jumlah spermatozoa pada Mencit *Balb/c* jantan yang dipapar asap rokok secara signifikan.

Kata Kunci : Asap rokok, dark chocolate, jumlah spermatozoa

ABSTRACT

THE EFFECT OF DARK CHOCOLATE TO SPERM COUNT OF *BALB/C* MICE WITH CIGARETTE SMOKE

Background : Cigarette smoke contains free radical compound that can interfere and decrease sperm count. Dark chocolate contains flavonoid as antioxidant which can reduce free radical chains damage effects

Objective: To observe the effect of dark chocolate to sperm count of male *Balb/c* mice with exposure of cigarette smoke.

Method : Random sampling and post test only control group design were adapted for this study. The sample were 40 male *Balb/c* mice which is divided into 5 group. Group K(-) was given standard meals only. Group K(+) was exposed to cigarette smoke only. Group P1 was

exposed to cigarette smoke and dark chocolate of 0,05 gr/day. Group P2 was exposed to cigarette smoke and dark chocolate of 0,1 gr/day. Group P3 was exposed to cigarette smoke and dark chocolate of 0,2 gr/day. This experimental research was carried out for a period of 28 days. On the 29th day, all samples were terminated and the sperm count was examined.

Results : Mean score of sperm count are: Group K(-)=22,9; Group K(+)=4; Group P1=11,5; Group P2=19,6; Group P3=20,6. There was significant difference in sperm count between groups that showed in Oneway ANOVA test and also significant differences between all group except K(-) and P2, K(-) and P3, P2 and P3 in Post Hoc test

Conclusions : Dark chocolate of 0,05 gr/day for a period of 28 days gives significant effect in increasing sperm count of Balb/c mice which is exposed by cigarette smoke.

Keywords : Cigarette smoke, dark chocolate, sperm count

PENDAHULUAN

Infertilitas, menurut Organisasi Kesehatan Dunia, WHO, didefinisikan sebagai ketidakmampuan terjadinya konsepsi spontan pada pasangan yang aktif secara seksual tanpa kontrasepsi setelah minimal 12 bulan.¹ Terdapat kurang lebih 60-80 juta pasangan infertil yang tersebar di seluruh dunia, dimana dapat ditemukan penyebab pria pada sekitar 40% dari kasus infertilitas yang telah dijelaskan tersebut.² Pada sebagian besar kasus infertilitas pasangan, faktor penyebab infertilitas pada pria dapat ditegakkan berdasarkan data seminal.³ Salah satu pemeriksaan mikroskopik yang dapat dilakukan untuk menganalisa karakteristik data seminal adalah pemeriksaan jumlah spermatozoa yang dapat menggambarkan produksi sperma dari testis dan patensi pada saluran post-testikular.¹

Kondisi lingkungan dan gaya hidup merupakan salah satu faktor resiko yang dapat mempengaruhi fertilitas dan kondisi seminal. Salah satu persoalan lingkungan serta gaya hidup yang dapat mempengaruhi kesehatan reproduksi pria adalah rokok, yang kandungan radikal bebasnya dapat menyebabkan efek berbahaya bagi berbagai jaringan tubuh manusia. Diperkirakan terdapat lebih dari 1 miliar perokok di seluruh dunia yang lebih dari 80% dari jumlah tersebut diketahui berasal dari negara-negara berkembang.⁴ Berbagai hasil penelitian telah menunjukkan bahwa merokok memiliki efek yang merugikan bagi manusia karena dapat berhubungan dengan subfertilitas pada pria berupa penurunan konsentrasi sperma, rendahnya motilitas sperma, dan penurunan persentase morfologi sperma normal.^{4,5}

Untuk menetralkan radikal bebas yang terbentuk, tubuh menghasilkan enzim-enzim yang berfungsi sebagai antioksidan yang dapat menghilangkan efek buruk dari radikal bebas tersebut. Apabila terjadi ketidakseimbangan dimana jumlah enzim antioksidan berkurang

sedangkan jumlah radikal bebas meningkat, maka dapat timbul berbagai macam kerusakan, salah satunya infertilitas. Untuk mengatasi hal tersebut, tubuh membutuhkan asupan zat antioksidan dari luar tubuh untuk menghambat proses kerusakan jaringan yang dapat ditimbulkan oleh asap rokok pada berbagai jaringan, yang dapat menimbulkan manifestasi pada sistem reproduksi pria sebagai penurunan jumlah spermatozoa.⁶

Berbagai penelitian telah dilakukan untuk menemukan dan menginovasi zat-zat yang dapat meningkatkan jumlah spermatozoa untuk meningkatkan fertilitas pria. Penelitian tersebut tidak hanya mencakup zat-zat kimia yang terkandung dalam obat-obatan, namun juga mulai memanfaatkan zat-zat yang terdapat di alam yang sekiranya memiliki manfaat yang sama sebagai antioksidan untuk menghentikan efek kerusakan yang dapat ditimbulkan oleh radikal bebas. Hal ini disebabkan oleh perkembangan pola pikir masyarakat yang tidak hanya melihat kandungan dari suatu zat sebagai tolak ukur untuk mengkonsumsinya, akan tetapi juga mengenai efek samping dari zat-zat tersebut, yang mendasari perilaku masyarakat untuk mencari sumber pertolongan lain selain obat-obatan.

Sementara itu, coklat adalah produk yang cukup diminati dan dikonsumsi oleh masyarakat di seluruh dunia. *Theobroma cacao L.* dan produk-produknya dikonsumsi di seluruh dunia dan dipelajari terutama karena kandungan antioksidan dan antiradikal sifat in vitro dari beberapa konstituen polifenol mereka, khususnya *procyanidins* dan flavanol.⁷ Terdapat beberapa jenis coklat yang dapat dibagi berdasarkan jumlah kakao yang dikandungnya, seperti coklat putih, coklat susu, dan *dark chocolate*. *Dark chocolate* memiliki kandungan komposisi kakao terbanyak dalam sediaannya, setidaknya 65%. *Dark chocolate* merupakan jenis coklat yang memiliki fungsi antioksidan tertinggi yang terdapat dalam kandungan senyawa *phenolic* dan flavonoid.⁸

Meskipun sudah diketahui manfaat dari *dark chocolate* sebagai zat antioksidan yang dapat menghentikan efek dari radikal bebas,⁸ akan tetapi hingga kini belum ada studi empiris yang melaporkan bagaimana pengaruh *dark chocolate* dengan dosis bertingkat terhadap jumlah spermatozoa pada orang yang terpapar asap rokok. Penelitian ini diharapkan mampu memberikan manfaat bagi masyarakat mengingat tingginya minat masyarakat terhadap *dark chocolate* yang diharapkan mampu menghambat efek radikal bebas yang ditimbulkan oleh asap rokok.

METODE PENELITIAN

Penelitian eksperimental, dengan metode *Post test only control group design* ini dilakukan pada mencit *strain Balb/c* dengan kriteria jenis kelamin jantan, berusia 6-8 minggu, memiliki berat 25-30 gram, aktif, dan tidak memiliki kelainan anatomis yang tampak. Besar sampel ditentukan berdasarkan ketentuan WHO, yaitu minimal 5 ekor dan cadangan 2 ekor tikus tiap kelompok. Besar sampel adalah 40 ekor yang terbagi menjadi 5 kelompok, dimana masing-masing kelompok terdiri atas 5 hewan penelitian dan 3 hewan cadangan.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah paparan asap rokok serta pemberian *dark chocolate*, sedangkan variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah spermatozoa.

Mencit diberikan masa adaptasi selama 7 hari dimana seluruh mencit diberikan makan dan minum standar. Selanjutnya, mencit dibagi menjadi lima kelompok: Kelompok Kontrol (-), yaitu kelompok yang hanya diberi makanan dan minuman standar. Kelompok Kontrol (+), yaitu kelompok yang diberikan paparan asap rokok. Kelompok Perlakuan 1, yaitu kelompok yang diberikan makanan dan minuman standar serta mendapatkan *dark chocolate* dosis 0,05 gram per oral 1 kali sehari. Kelompok Perlakuan 2, yaitu kelompok yang diberikan makanan dan minuman standar serta mendapatkan *dark chocolate* dosis 0,1 gram per oral 1 kali sehari. Kelompok Perlakuan 3, yaitu kelompok yang diberikan makanan dan minuman standar serta mendapatkan *dark chocolate* dosis 0,2 gram per oral 1 kali sehari. Perlakuan selama 28 hari, pada hari ke-29 semua mencit diterminasi dan diperiksa jumlah spermatozoanya

Seluruh data yang diperoleh diuji normalitasnya dengan uji *Saphiro-Wilk*. Bila diperoleh distribusi data normal, maka dilakukan uji homogenitas dengan uji *Levene*. Bila data berdistribusi normal dan homogen analisa dilanjutkan dengan *Oneway Anova*, dan jika didapatkan hasil yang bermakna dapat dilanjutkan dengan uji statistik *Post Hoc Tests (Multiple Comparisons)*.

HASIL**Tabel 1.** Uji Normalitas dan Uji Homogenitas

Kelompok	Saphiro-Wilk	Levene
	Sig.	Sig.
Kontrol (-)	0,855	0,061
Kontrol (+)	0,760	
Perlakuan 1	0,735	
Perlakuan 2	0,355	
Perlakuan 3	0,896	

Keterangan : $p > 0,05$: data berdistribusi normal dan homogen

Tabel 2. Hasil Uji *Oneway ANOVA*

Kelompok	Sig.
Kontrol (-)	<0,001
Kontrol (+)	
Perlakuan 1	
Perlakuan 2	
Perlakuan 3	

Keterangan : $p < 0,05$: perbedaan signifikan

Tabel 3. Hasil Uji *Post-Hoc*

	Kontrol (-)	Kontrol (+)	Perlakuan 1	Perlakuan 2	Perlakuan 3
Kontrol (-)	-	<0,001	0,001	1,000	1,000
Kontrol (+)	<0,001	-	0,044	<0,001	<0,001
Perlakuan 1	0,001	0,044	-	0,024	0,009
Perlakuan 2	1,000	<0,001	0,024	-	1,000
Perlakuan 3	1,000	<0,001	0,009	1,000	-

Keterangan : $p < 0,05$: perbedaan signifikan

Dari Tabel 1, didapatkan data dengan distribusi normal ($p > 0,05$) dan dengan varian yang homogen ($p > 0,05$). Dari Tabel 2, didapatkan hasil dari uji *Oneway ANOVA* menunjukkan nilai $p < 0,005$ yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan antara kelima kelompok tersebut. Dari Tabel 3, didapatkan hasil dari uji *Post Hoc* menunjukkan perbedaan

bermakna antara Kontrol (-) dengan Kontrol (+), Kontrol (-) dengan Perlakuan 1, Kontrol (+) dengan Perlakuan 1, Kontrol (+) dengan Perlakuan 2, Kontrol (+) dengan Perlakuan 3, Perlakuan 1 dengan Perlakuan 2, dan Perlakuan 1 dengan Perlakuan 3. Perbedaan tidak bermakna terdapat diantara Kontrol (-) dengan Perlakuan 2, Kontrol (-) dengan Perlakuan 3, dan Perlakuan 2 dengan Perlakuan 3.

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian *dark chocolate* terhadap jumlah spermatozoa mencit *Balb/c* jantan yang diberi paparan asap rokok. Besar sampel adalah 40 ekor yang terbagi menjadi 5 kelompok, dimana masing-masing kelompok terdiri atas 5 hewan penelitian dan 3 hewan cadangan. Dari ke-12 tikus wistar tersebut dibagi menjadi 2 kelompok yaitu 6 ekor tikus wistar sebagai kelompok control dan 6 ekor tikus wistar sebagai kelompok perlakuan yang diberi injeksi intraperitoneal LPS dan melatonin via sonde oral.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian paparan asap rokok pada kelompok kontrol (+) memberikan penurunan yang bermakna terhadap jumlah spermatozoa bila dibandingkan dengan kelompok kontrol (-) yang tidak diberi paparan asap rokok.

Asap rokok mengandung berbagai zat toksik yang kompleks, beberapa dari zat tersebut adalah radikal bebas. Asap rokok dapat diuraikan menjadi gas dan partikulat. Beberapa unsur pokok pada asap rokok dalam bentuk gas adalah CO, CO₂, NO, NO₂, dan HCN. Beberapa unsur asap rokok dalam bentuk partikulat adalah tar, nikotin, metal, fenol/semikuinon/kuinon. Kandungan CO dalam asap rokok dapat menyebabkan berkurangnya kemampuan darah dalam membawa oksigen yang dapat mengakibatkan kematian sel karena minimnya suplai oksigen. Nikotin adalah agen oksida yang potensial dan dapat mempengaruhi integritas membran plasma dan DNA sperma. Nikotin dalam asap rokok dapat menstimulasi medulla adrenal untuk melepaskan katekolamin yang dapat mempengaruhi system saraf pusat, sehingga mekanisme umpan balik antara hipotalamus, hipofisis anterior, dan testis terganggu. Akibatnya, proses sintesis hormon testosteron dan spermatogenesis akan terganggu. Penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa paparan asap rokok selama 45 hari dapat menyebabkan berkurangnya diameter tubulus seminiferus sehingga jumlah spermatozoa yang diproduksi berkurang.⁹

Hasil ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa pemberian paparan satu hingga empat batang asap rokok setiap harinya selama 30 hari menunjukkan penurunan kualitas spermatozoa mencit yang dinilai dari konsentrasi, morfologi, dan motilitas spermatozoa.¹⁰

Pada penelitian lain yang dilakukan oleh G. Phillips, 54 dari 72 orang perokok mengalami penurunan jumlah spermatozoa. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa antibodi antisperma meningkat pada perokok yang menyebabkan berkurangnya jumlah spermatozoa. Perokok juga diketahui memiliki konsentrasi non metiltetrahidrofolat yang dapat menyebabkan berkurangnya jumlah spermatozoa.⁴

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian *dark chocolate* dengan dosis 0,05 gram setiap harinya pada kelompok Perlakuan 1 yang dipapar asap rokok memberikan perbedaan jumlah spermatozoa yang bermakna bila dibandingkan dengan kelompok Kontrol (+) yang hanya diberikan paparan asap rokok tanpa *dark chocolate*, juga bermakna bila dibandingkan dengan kelompok Kontrol (-) yang hanya diberi pakan dan minum standar tanpa asap rokok dan *dark chocolate*, serta bermakna pula bila dibandingkan dengan kelompok perlakuan 2 dan 3 yang masing-masing diberi *dark chocolate* dengan dosis 0,1 dan 0,2 gram setiap harinya. Hal ini menunjukkan bahwa *dark chocolate* dengan dosis 0,05 gram memang mampu meningkatkan jumlah spermatozoa mencit yang dipapar asap rokok, namun belum mampu mengoptimalkan jumlah spermatozoa untuk menjadi setara dengan kelompok kontrol (-) yang belum menerima paparan asap rokok. Dapat diketahui pula bahwa jumlah spermatozoa mencit yang diberi *dark chocolate* 0,05 gram belum dapat setara dengan jumlah spermatozoa mencit yang diberi *dark chocolate* 0,1 gram dan 0,2 gram.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian *dark chocolate* dengan dosis 0,1 gram setiap harinya pada kelompok Perlakuan 2 yang dipapar asap rokok memberikan peningkatan jumlah spermatozoa yang bermakna bila dibandingkan dengan kelompok kontrol (+) yang hanya diberikan paparan asap rokok tanpa *dark chocolate*. Hal ini menunjukkan bahwa dosis yang dibutuhkan oleh *dark chocolate* untuk meningkatkan jumlah spermatozoa adalah 0,1 gram setiap harinya.

Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa jumlah spermatozoa kelompok Perlakuan 2, yang diberi paparan asap rokok dan *dark chocolate* 0,1 gram setiap harinya, tidak memiliki perbedaan yang signifikan bila dibandingkan dengan kelompok Kontrol (-), yang hanya diberi

pakan dan minum standar tanpa asap rokok dan *dark chocolate*, serta tidak signifikan dengan kelompok Perlakuan 3, yang diberi paparan asap rokok dan *dark chocolate* 0,2 gram setiap harinya. Hal ini berarti bahwa jumlah spermatozoa yang didapatkan dari mencit pada kelompok Perlakuan 2 setara dengan jumlah spermatozoa dari mencit pada kelompok Kontrol (-) dan kelompok Perlakuan 3. Sehingga, dapat diketahui bahwa pemberian *dark chocolate* dengan dosis 0,1 gram saja sudah cukup untuk meningkatkan jumlah spermatozoa mencit yang telah mengalami paparan asap rokok 1 batang perhari untuk menjadi setara dengan jumlah spermatozoa mencit yang tidak terpapar asap rokok.

Pemberian *dark chocolate* dapat meningkatkan jumlah spermatozoa mencit *Balb/c* jantan yang dipapar asap rokok karena dark chocolate mengandung senyawa polifenol yang merupakan antioksidan yang dapat memperbaiki kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas yang terkandung dalam asap rokok. Senyawa polifenol pada kakao terkandung dalam sel pigmen kotiledon. Penelitian ini menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan tertinggi terdapat pada *dark chocolate* murni dalam bentuk bubuk seperti yang digunakan dalam penelitian ini.¹¹

Flavonoid bekerja sebagai antioksidan primer yang juga disebut sebagai antioksidan pemecah rantai yang mampu menetralkan senyawa lipid radikal bebas dengan menghentikan transfer hidrogen pada senyawa radikal.¹²

Flavonoid memiliki kemampuan aktivitas penangkapan terhadap radikal bebas karena memiliki gugus hidroksil pada cincin B. Keberadaan gugus tersebut juga membuat flavonoid bersifat polar sehingga dapat berikatan hidrogen dengan kepala lipid pada membrane sel sehingga dapat melindungi sel dari serangan radikal bebas yang dapat mengakibatkan kerusakan sel. Flavonoid juga dapat menstabilkan ROS dengan bereaksi dengan senyawa yang bersifat radikal dalam ROS tersebut sehingga senyawa tersebut menjadi tidak aktif. Mekanisme lain adalah dengan mengikat ion Fe^{3+} yang dibutuhkan pada reaksi katalis pembentukan radikal hidroksil yang sangat reaktif. Senyawa polifenol, dalam hal ini flavonoid juga dapat meningkatkan kerja enzim antioksidan dalam tubuh seperti GSH yang dapat mengubah molekul H_2O_2 dan lipid peroksida menjadi H_2O . Enzim GSH yang berada di sitoplasma akan bekerja pada membrane fosfolipid yang teroksidasi radikal bebas.¹³

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Terdapat penurunan jumlah spermatozoa yang pada mencit *Balb/c* jantan yang dipapar asap rokok sebanyak 1 batang setiap harinya, dibandingkan dengan mencit tanpa paparan asap rokok. Pemberian *dark chocolate* dengan dosis 0,05 gram dapat meningkatkan jumlah spermatozoa namun belum sebanding dengan kondisi tanpa paparan asap rokok. Dosis *dark chocolate* terbaik untuk meningkatkan jumlah spermatozoa adalah 0,1 gram per hari.

Saran

Dapat dilakukan penelitian mengenai pengaruh pemberian *dark chocolate* terhadap jumlah spermatozoa mencit yang dipapar asap rokok dengan dosis dan sediaan *dark chocolate* yang berbeda. Dapat pula dilakukan penelitian mengenai pengaruh pemberian *dark chocolate* terhadap jumlah spermatozoa mencit yang dipapar asap rokok dengan frekuensi paparan asap rokok dan frekuensi pemberian *dark chocolate* yang berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

1. Jungwirth A, Diemer T, Dohle GR, et al. *Guidelines on Male Infertility. European Association of Urology*; 2015.
2. Meniru GI. *Cambridge Guide to Infertility Management and Assisted Reproduction.*; 2014. doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2.
3. Cavallini G, Beretta G. *Clinical Management of Male Infertility.* (Cavallini G, Beretta G, eds.). Cham: *Springer International Publishing*; 2015.
4. Philip GH, Dereddy Nagalinga Reddy, Kadiri Pullanna, Gundala Harold Philip. *Effects of Cigarette Smoking on Semen Parameters of Men. Department of Zoology, Sri Krishnadevaraya University, Ananthapuram- 515003. A. P., India.* 2015;6(10):4310-4315. doi:10.13040/IJPSR.0975-8232.6(10).4310-15.
5. Paper O. *Effects of Smoking on Testicular Function And Fertilizing Potential in Rats.* 1998;45-49.
6. Lombardo F, Sansone A, Romanelli F, Paoli D, Gandini L, Lenzi A. *The Role Of Antioxidant Therapy in The Treatment of Male Infertility: An Overview.* *Asian J Androl.* 2011;13(5):690-697.

7. Andújar I, Recio MC, Giner RM, Ríos JL. *Cocoa polyphenols and their potential benefits for human health. Oxid Med Cell Longev.* 2012.
8. Meng CC, Maleyki A, Jalil M, Ismail A. *Phenolic and Theobromine Contents of Commercial Dark, Milk and White Chocolates on the Malaysian Market. Molecules.* 2009;14(1):200-209.
9. Putra Y. Pengaruh Rokok Terhadap Jumlah Sel Spermatozoa Mencit Jantan (*Mus Musculus*, Strain Jepang). *J Sainstek.* 2014;VI(1):30-42.
10. Batubara IVD, Wantouw B, Tendean L. Pengaruh Paparan Asap Rokok Kretek Terhadap Kualitas Spermatozoa Mencit Jantan (*Mus Musculus*). *J E-Biomedik.* 2013;1(1):330-337.
11. Ibric A, Cavar S. *Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Cocoa and Chocolate Products. Bulletin of Chemical Technology Bosnia Herzegovina.* 2014;42:37-40.
12. Latif R. *Chocolate / Cocoa and Human Health : A Review. Netherl J Med.* 2013;71(2):63-68.
13. Setyaningsih VR. Pengaruh Pemberian Infus Simplisia Rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*) secara Oral terhadap Kualitas Spermatozoa Mencit (*Mus musculus L.*) Jantan Galur DDY. 2011.